

TRYPTOPHAN OPERON, PEPTIDE AND PROTEIN CODED THEREBY, UTILIZATION OF TRYPTOPHAN OPERON GENE EXPRESSION AND PRODUCTION OF TRYPTOPHAN

[71] Applicant: AJINOMOTO CO INC

[72] Inventors: MATSUI KAZUHIKO;
SANO TAKANOSUKE;
MIWA KIYOSHI;
OTSUBO EIICHI

[21] Application No.: JP61087600

[22] Filed: 19860416

[43] Published: 19871024

1. **Identify the problem.** The first step in the problem-solving process is to identify the problem. This involves recognizing the issue, understanding its scope, and determining its impact.

2. **Analyze the problem.** Once the problem is identified, the next step is to analyze it. This involves breaking the problem down into its components, identifying the causes, and determining the underlying factors.

3. **Generate solutions.** The third step is to generate potential solutions. This involves brainstorming ideas, considering different perspectives, and evaluating the feasibility of each option.

4. **Implement the solution.** Once a solution has been chosen, the next step is to implement it. This involves developing a plan, allocating resources, and executing the solution.

5. **Evaluate the results.** The final step is to evaluate the results of the solution. This involves monitoring progress, assessing the effectiveness of the solution, and making adjustments as needed.

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce the titled tryptophan in a large amount, by cultivating a microorganism transformed by a DNA sequence capable of coding an enzymic group of a tryptophan synthetic system, etc., in a culture medium.

CONSTITUTION: A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of *Brevibacterium lactofermentum*, etc., of the genus *Brevibacterium* is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RAN, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium. COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01500 C07H02104 C07K01300 C12P01322
C12P02102 C12P01322 C12R00113 C12P01322 C12R00115

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244382

⑪ Int. Cl.⁸

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 N 15/00

7115-4B

C 07 H 21/04

7138-4C

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 P 13/22

A-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされる
ペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法
及びトリプトファンの製造法

⑯ 特 願 昭61-87600

⑰ 出 願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年
会プログラム・講演要旨集」により発表

⑱ 発 明 者 松 井 和 彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑱ 発 明 者 佐 野 孝 之 輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑱ 発 明 者 三 輪 清 志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑱ 発 明 者 大 坪 栄 一 東京都文京区西片1-13-6
⑳ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファン
オペロンにコードされるペプチド及び蛋白、
トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用
方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) m-RNA の合成をコントロールするオペレー
ター領域、m-RNA の合成をコントロールするプロ
モーター領域、m-RNA の合成をコントロールする
アテニューエーター領域、蛋白合成に必要なリボゾ
ームとm-RNA との結合領域、リーダーペプチドを
コードする領域、トリプトファン合成系の酵素群
をコードする領域及び最後にm-RNA の合成を停止
させるシグナルを形成するターミネーター領域が
含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCGGCTTCTG GGCATTGGTG TCCCTGAGGT GCGTAAATCC CAAGAATTGT GGGATATGGC GCACCGTGTG GCTGGCCCGT TGTGGGTGCT GTGGGGAGTT
 GGGCCAAACAC CCGTAAGCAC AGGGACTCCA CGCATTTAGG GTTCTTAACA CCGTATACCG CGTGGCAGAG CGACCGGGCA ACACCCACGA CAGCCCTCAA
 TCCTTTGTTA TTGCCTCGCT ACTTGGCTTT GTGGCTTCT GTTTGGATGT GCGTGGTGGT GGCATTGGGT GTTGTGGCTG CCATCGTGTT CATTCGCATG
 AGGAAACAAT AACGGAGCGA TCAACGCAAA CACCGGAAGA CCAACCTACA CCGAACCGCA CCGTAACCCA CAACAGCGAC GGTAGCACAA GTAACCGTAC
 GGTGGGGTA TGGCTGCCA TACTGTTECG ATGGTTGATG CGAACGCAGT CGCGAAACCC CGCAGGCGCG TGTTCCTGCT GAAATTGAAG AGGAGGCGCG
 CCACGCCCCAT ACCGACGCGT ATGACAACCG TACCAACTAC GCTTGGCTCA GCGCTTTGGG GCGTCCGCGG ACAGAGGCGA CTTTAACCTC TCCTCGGCGC
 TGGTGTGACT ATTACCTCGC CGATTATCAA CAGACTCCG CTGAATGCCC CCAAGATTGA CTTGCATGCA GTGGGTAGAG CTGGCGAAAG TACACAAGAA
 ACCACACTGA TAATGAGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGGC GACTTACGGG GGTCTAACT GAACCTAGCT CAGCGCATCTC GACGCTTTTG ATGTGTTCTT
 CCGAAAAATG ATTAATAATT CAGACAAGCT TCCCACTATG TGATAAGTC CCATTTTCTG AATAACTCTT GTCTCAGTCA AAGCACCCAG TGGTGGTGGC
 GGTTTTTAC TAATTATTAA CTCTGTTCCA AGCGTGATAC ACTATTTCAG GGTAAACAC TTATTGAGAA CAGACTCAGT TTCGTGGCTC ACCACCCCG
 GCGCTAACTA AGCGAGCCTG ACACCTCAAG TTGTTTTAC TTTGATGAAT TTTTAAAGCG TCGTACTTCC TTGCAGGAAG AAGCGGGCTT TTTGTGTTT
 CCGGATTGAT TCGCTCGGAC TGTGAGTTC AACAAAAGTG AAACCTACTTA AAAAATTCCG AGCATGAAGC AAGCTGCTTC TTCGCGCGGA AACACCCAA
 TTAGCCCAAC ACCGGAACCG CCGGATCGA ATGAAGCTCG CAGCGAGTAA TTATTGATG TTTCCAGAA AGGCTTCAGC CCCACAATGA TTTCTCGGT
 AATCGGGTGT TGGCGTTTC GGACCTAGCT TACTTCGAGC GTGCGTCATT AATAAACTAC AAAGGGTCTT TCGGAAGTCG GGTGTACT AAAGGAGCCA
 AGGTGCCCCA TGAGCAGGAA TCCCATGTT TTCTCCCTAG ATGTCCGCTA TCACGAGGAT GCTTCTGCTT TGTTCGCCA CTTGGGTGGC ACAACCGCAG
 TCCACGGGGT ACTGTGCTT AGCGGTACAA AAGAGGGATC TACAGGCGAT AGTGTCTCTA CGAAGACGCA ACAACGGGT GAACCCACCG TGTGGCGTC
 ATGATGCAGC CCGTTTGAA AGCGCTGATA TCACCACCAA GAATGCTATT TCTTCCCTCG CCGTGTGAA GAGTTCGGTG CGCATTAGT GCACGGGCAA
 TACTACCTCG GCACAACCTT TCGCGACTAT AGTGGTGGT CTTACCATAA AAGAGGGAGC GCCACAACCT CTCAGGCCAC CGGTAATGA CGRPGCCCTT

CACGGTGCTA ACCGAGCGCG TGACGGACTC GGTAGGGCA GTGGTTGGCG CCCTAACACA GCAGCTTGGC CAGTACAACA CCGCAGAGAA CACCTTTAGC
 GTGCCACCAT TCGCTCGGCG ACTGCGTAC CCGATCCCGT CACCAACCGG CCGATTGTGT CCGCGAACCG GTCATGTTGT GCGGTCTCTT GTGGAATCG
 TTCCCGCGCT CCGATCGCGT TGATGAGCGC GAGCGCTCA CCGCACCAAG CACCATCGAA GTGCTGCCA AGTTCAGTT CGAGTCCGGC TACAGCGAGC
 AAGGGCGGGA CGCTACCGCA ACTACTCGCG CTCGCGGAGT GCGCTGGTTC GTGTAGCTT CAGCAGCGCT TCAACCTCAA GCTCAGCGCG ATGTGCTGCG
 CGTCCCTGCC ACTGCTCATG GCGGTTTTC CTTTGATTT CTAGAACCC TTTGAAACCG TCCCGCGAGT CGAGGAAAGC GTCAACACTT ACCCGGATTA
 CGAGGAGCGG TGACGAGTAC CCGCAAGCG GGAACATAA GAATCTTTGG AAATTTTGG AGGCGCGTCA GTCCTTTTC CAGTTGTGAA TCGGCTAAT
 CCAGTTCGTC CTCGCGGAAA TCGTCTGGA CATCAATCAC CAGGACCAGA CCGCCAAACT CACCGCGGTC TCCAACCGCC CAGGCGAGCT CGAGGCGGAG
 GGTCAAGCAG GAGCGCTTT AGCAGGACCT GTAGTTAGTG GTCTGCTCT GCGGTTTGA GTGGCGCGAG AGGTTGCGGG GTCCGCTCGA CTTCCGCTC
 CTCACAAGC TTTTATTGCT TATCGAGCGC GCGCTCCCGC CAACCGAACA CGCTACCAA ACCACCCCTC ACCAGCGCGA CACTGTTGCG GTTGTGGCTG
 GAGTGTGTC AAGTAACGA ATAGCTCGCG GCGGAGGGCG GTTGGCTGT GCGGATGCTT TGGTGGGAG TGTGCGCGT GTGAGAGCG CAACACCGAC
 ATATTCCCGA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATGAGCT GAAAGAAAAC ATTTACAAGC GTGACATCTA CCAAGTTGTC CCGCGCGCGA CTTTACCGCG
 ATATTGGGCT ACGAGTCAAG CGCTGAGCT ACTTACTCGA CTTTCTTTTG TAAATGTTGC CACTGTAGAT GGTTCACAG GCGCGCGCGT GAAAGTGGCG
 ACCATGTCCT GATGCATTTC CTGCTTATCT GCAGCTCGCT GCCACCAACC CGTGGCGGTA CATGTTCTAT ATCCGTGCGC TCAACGAAGG TCGTCTCTAT
 TGGTACGGA CTACGTAAAG GACGAATAGA CGTCCACCGA CCGTGGTTGG CGAGCGCGAT GTACAAGATA TAGGCACCTG AGTTGCTTCC AGCGAGGATA
 CAACTTTTTG GCGCATCCCC TGAGTCCAAC CTCAGTTCA CCGCTGCTAA CCGTGAGCTG CAGCTGTACC CAATCGCAGG TACCGCGCGC CGTGGACTCA
 CTTGAAAAAC CCGGTAGGGG ACTCAGGTTG CAGTTCAACT GCGGACGATT GCGACTCGAC GTGACATGG GTTAGCGTCC ATGGCGCGCG CCACCTCAGT
 ACCGAGATGG CTCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCGCAA TGAGTTGGAT ATGCGCAGTG ATGCCAAGA GATCGCGGAC GACACCATGC TTTGTGATCT
 TGGTCTACC GAGGTAGTTG CTACTCGATC TATAGCGCTT ACTCAACCTA TACGCGTGAC TACGGTTTCT CTAGCGCGCT CTGTGGTACG AACAGCTAGA
 CCGCGGCAAC GACCTCGCGC GCGTCTCGGT CCGAGCGTGC CCGCGGGTTC CGGATCTTTT GCAGGTGGAT CGCTATTCCC CCGTGATGCA CTTGGTCTCC
 CCGCGCGTTG CTGGAGCGGG CGCAGCGCA GGTGCGCAGC CCGCGCCAAC GCCTAGAAAA CGTCCACCTA CGGATAAGGG CGCACTACCT GAACACAGG

特開昭62-244382 (3)

CGTGTGACCG CGACGTTGGA CCCAGAGCTT GATGCTTTGG ACGCCTATCG GCGGTGCATG AATATGGGCA CGTTGACCGG CGCTCCGAAG TTGCGCGCTA
GCACACTGCC GCTCCAACCT GGGTCTCGAA CTACGAAACC TCGGGATAGC CGGACGCTAC TTATACCGGT GCAACTGGCC GCGAGGCTTC AACCGCGGAT

TGGAGCTGTT GCGCGGCGTC GAAAAGCGCA GCGGTGGTTT TTATGGTGGG CGAGTGGGGT ACCTCGCGCG CAATGGCGAT ATGGATAATT GCATTGTTAT
ACCTCGACAA GCGCGGCGAG CTTTTGCGGT CCGCACCAAG AATACCACCC GGTACCCCA TGGACGCGCC GTTACCGCTA TACCTATTAA CGTAACAATA

TCGTTGCGGG TTTGTCCAGG ATGGTGTGGC TGCTGTCCAG GCTGGTGGTG GTGTGGTCCG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AAGCGGATGA GACGTTCCAC
AGCAAGCGCG AACAGGTCC TACCACACCG ACGACATGTC CGACCACGAC CACACCAGCG GCTAAGATTA GGAGTTAGAC TTCGGCTACT CTGCAACGCTG

AAGCGGTATG CCGTGTGGA TGGCATTGCG CTGGCTGGTG GTTCCACTTT GGAGGTCATC CGATCACACA CGTTGTTCTC ATTGATAATC ACGATTCTTT
TTCCGCATAC GGCACAACTT ACGGTAAAGC GAACGACGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAGAG TAACCTATTAG TGCTAAGAAA

TGCTACAAAC CTGGTGGATG CGTTGCGCGT GCGCGGTTAT AAGTCCACCG TGTTCCGCAA TACGCTGCCA GTTGAACCA TTTTGGCAGC CAACCCGGAC
ACAGATGTTG CACCACTTAC GCAAGCGGCA CCGGCAATA TTACGCTGCC ACAAGGCGTT ATGCCACGGT CAACTTTGGT AAAACCGTGC GTTGGCGCTG

CTGATCTGCC TTTACCTGG ACCTGGTTAC CTTGCCGATG GCGGCAACAT GATGCGCGTG ATCGAGCGCA CACTCGGCCA GATTCTTTTA CTGGCTATTT
GACTAGACGG AAGTGGAGC TGGACCAATG GGACGGGTAC GCGCGTTGTA CTACCGCGAC TAGCTCGCGT GTGAGCGCGT CTAGCGAAAT GACCCA7AAA

GCGTGGGCTA CGAGGCACTC ATCGAATACC ACGCGGCGAA GGTGAGCGCT TGTTGGCGTG TGCACGGCAC CACCGACAAC ATGATCCTTA CTGATGACGG
CGGAGCGGAT GGTCCGTGAG TAGCTTATGG TGCGCGCGTT CCAACTCGGA ACACCGGGAC ACCTGCCGTG CTGGCTGTTG TACTAGGAAT GACTACGTC

TGTGACAGGC CCGTTTTTTC CAGGTCTTGG CACTGATGTT GAGCCTGATC ATCCAGAAGT CCCAGGCGCG AAGGTTCCAA TTGGCGGTTA TCACTCACTG
ACAGCTCTCG GGACAAAAAC GTCCAGAACC GTGACTACAA CTGGCACTAG TAGGTCTTCA GGGTCCGGCG TTCCAAGGTT AACCGGCAAT AGTGAATGAC

GCGTGGCTGG TTGCCCCAGA CGGTATTGAA TCATTGGGCA CCGTCTCTCT TGAGATTGGT GATGTATCA TGGCGGCAGC CACCAACCGT GGAAGGCGCA
CGGACGCAAC AACGGGGTCT GGCATAACTT AGTAACCGGT GGACAAGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT ACCGCGCTGC GTGGTGGCTA CCGTTCCGGT

TTGGCCTGCA GTTACCCCT GAGTCAGTGC TGAGCCCAAC GGGTCTATC ATTTTGTCCC GCTGTGTGGA ACAACTTCTC GCGAATAAT AAAAAGGATT
AACCGGAGCT CAAAGTGGGA CTCAGTCAGC ACTCGGGTTG CCCAGGATAG TAAACACGCG CGACACAGCT TGTGAAGAG CCGTTGATTA TTTTCTCTAA

TGATTATGA CTTCGCCAGC AACACTGAAA GTTCTCAACG CCTACTTGGA TAACCCCACT CCAACCGCTG AGGAGGCAAT TGAGGTGTTG ACCCCGCTCA
ACTAAGTACT GAAGAGGTCG TTGTGACTTT CAAGAGTTGG GATGAACCT ATTGGGGTGA GGTGGGACC TCCTCCGTTA ACTCCACAAG TGGGCGGACT

CGCTGGCTGA ATACGATGAC GTGCACATCG CAGCGCTGCT TCGGACCATC CCGTACTCGCG GTGAGCACTT CGCTGATATT GCGGCGCGTG CCAAGGCATT
GGCAECCACT TATGCTACTG CAGCTGTAGC GTCGCGACGA ACCTGGTAGG GATGAGCGCG CACTGCTCA GCGACTATAA GCGCGCGGAC GGTTCGCTAA

CCTCGCGCGG GCTCGTCCGT TCCCGATTAC TGGCGCAGGT TTGCTAGATT CCGCTGGCAC TGCTGGCGAC GGTGCCAACA CCATCAACAT CACCAACGGG
GGAGCGCGCG CGAGCAGGCA ACGGCTAATG ACCGCTTCCA AACGATCTAA GCGGACCGTG ACCACCGCTG CCACGGTTGT GGTAGTTCTA GTGGTGGCGG

GCTTCCCTGA TCGCAGCATC CGGTGGAGTG AAGCTGGCTA AGCACGGCAA CCGTTCAGTG AGCTCCAAGT CCGGTTCCCG CGATGTGCTG GAGGGGCTGA
CGAAGGCACT AGCGTCTAG GCCACCTCAC TTGGACCGAT TCGTGCGGTT GGCAAGTCAC TCGAGGTTCA GGCGAAGGCG GCTACACGAC ATCCGCGACT

ATATTCTTTT GGGCCTTGAT GTGGATCGTG CTGTGAAGTG GTTGAAGCG TCCAACCTTA CCGTCTGTT CACACCTGCG TACAACCTG CGATTGCGCA
TATAAGGAAA CCGGGAACCTA CACCTAGCAC GACACTTCAC CAAGCTTCG AGGTTGAAGT GGAAGGACAA GTGTGACGC ATGTTGGGAC GCTAAGCGCT

TGTGACCGCG GTTCCGCGAG CGCTGAAAT CCCACCATC TTCAACACCG TTGGACCAAT GCTGTCCCGG GCGCGCGCGG AGCGTCAGAT CATGGGCGTG
ACACGTCGGC CAAGCGGTCC GCGACTTTAA GGGGTGGTAG AAGTTGTGCG AACCTGGTAA CGACAGGGCG GCGCGCGCGG TCGCAGTCTA GTACCGCGAC

GCCAATGCCA ATCATGGACA GCTCATCGCG GAGCTCTTCC GCGAGCTCGG CCGTACACCG GCGCTTCTTG TCGATGGCGG AGCGACCGAT GAGATCGCAG
CGCTTACGCT TAGTACCTGT CGAGTAGCGG CTCCAGAGG CGCTCGACCG GCGATGTGCG GCGGAACAAC ACGTACCGCG TCCTGGGCTA CTCTACCGTG

TCCACGGCAC CACCTTGGTG TGGGAGCTTA AAGAAGACGG CACCATCGAG CATTACACCA TCGAGCGCTG GGACCTTGGC CTTGGCGCGT ACACCTTGA
AGGTGCGGTC GTGGAACCA ACCTCGAAT TTCTTCTGCC GTGCTAGCT GTAATGTGCT AGCTCGGACT CCGGAACCG GAACCGCGCA TGTGGGAAT

GGATCTCGTG GGTGGCGTGG GCACTGAGAA GCGCGAAGCT ATCGCGGCTA GTTTCGCGCG CACCGCGCGT GATGCACAC GTGATCGGTT CCGTGGCTCC
CTAGAGCAC CCACCGGAGC GGTGACTCTT GCGGCTTCCA TACGCGCGAT GAAAGCGCGG GTGGCGGGGA CTAGCTGTGG CACTACGCAA CCGACGCGAG

GCAGGTGCGA TGTCTATCT CAACGGCGAT GTGAGCTCT TGAAGCATCG TCACAAAAAG GCGCTTCTCT TGCTTCCGA GCGGACGACC CAGGCAATGT
CGTCCAGCT ACAAGATAGA GTTGGCGCTA CAGCTGAGGA ACTTCTTACC ACGTGTTTTG GCGGAAGGGA ACCAACCGCT CGCTGCTGCG GTCCGTACCA

特開昭62-244382 (4)

TGCCCAAGCA CGAAGACATC GATTACTCAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGCCCACGG TCTTGGAAAG CATEGTGCGG GGTCTCTCCG
 ACCGGTTGGT GCTTCTCTAG CTAAATGAGTC TTTTCTCTAG AAGGTTACTG ATCATTATTA GACGGGTGCC ACAACCTTTC GTAGCACCTC CCAGCAGCGC
 GACACCTGGA GGAATTTCCG GCTCGCATCG CTCACGTGGA TGTGGATGCG CTTCACAAAT CCACCCGCTC TCTGTTGCGT TCCCTCAACC AGGGTAGGGG
 CTGTGGACCT CTTTAAGCG CGAGGCTAGC GAGTGACCTT ACACCTACGC GAAGGTTTGA GGTGGGGCAG AGACAAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCC
 AGGGGGCGCT TTCATCATGG AGTCCAAGTC CGCATCGCCT TCTTTGGGAA TGATTGCTGA GCACTACCAAG CCGGGTGAAG TCGCTCGCGT GTACTCTCGC
 TCCCGCGCA AAGTAGTACC TCACGTTTCA GCGTAGCGGA AGAAACCTTT ACTAAGCACT CGTCATGCTC GGGCCACTTT AGCGAGCGCA CATGAGAGCG
 TACGCAGCGG CAATTTCCGT GCTGTCCGAG CCGGATCGTT TTGGTGGCGA TTACGATCAC CTCGCTACCG TTGGCGCTAC CTCTCATCTT CCGGTGCTGT
 ATGCGTCCCG GTTAAAGGCA CCACAGGCTC GGGCTAGCAA AACCAACCGT AATGCTAGTG GAGCGATGGC AACCGCGATG GAGAGTAGAA GGGCACCACA
 GCAAGACTT CATCATTGAT CCGTCCAGG TACGACCGCG GCGTTACTTT GGTGCTGATG CCATCCTGCT CATGCTCTCT GTGCTTGATG ATGAAGAGTA
 CGTTTCTGAA CTAGTAAGTA GGACAGGTCC ATGCTGGCGG CGCAATGAAA CCACCACTAC GGTAGGACGA GTACGAGACA CACGAAGTAC TACTTCTCAT
 CGACGCACTC GCTCGCGAGG CTGCGCGTTT TGATCTGGAT ATCTCAGCG AGGTTATTGA TGAGGAGGAA CTCGCGCGCG CCATCAAGCT GGGTGGCAAG
 GCTGGGTGAG CGACGGCTCC GACCGCGAAA ACTACACCTA TAGGAGTGGC TCCAATAACT ACTGCTCTCT CAGCGGGCGG GGTAGTTCCA CCGACGCTTC
 ATCTTTGGCG TCAACCAAGC CAACCTGCAT GATCTGTCCA TTGATTGGA TCGTTACCT CCGCTGTCCA AGCTCATTCG AGCAGATGCC GTGCTCTGT
 TAGAAACCGG AGTTGGTGGC GTTGGACCTA CTACACAGCT AACTAAACCT AGCAAGTGCA CGCGACAGGT TCGAGTAAGG TCGTCTACGG CACGAGCACA
 CTGAGTCTGG GGTGGCGGAT ACCGAAACCG TCGCGCAGCT AGGTGGGCGC TCCAATGCAT TCGTCTGTTG CTCCAGCTG ACCAGGCGAG AAAACGTCGA
 GACTCAGACC GCACGGCTTA TGGCTTTGGC AGCGGGTCCA TCCACCGCTC AGGTTACCTA AGGAGCAACC GAGGGTGGAC TGGTGGGTCC TTTTGCAGCT
 TCTGGCAGCG CGCGAATTGG TCTACGGCGC CAACAAAGTC TCGGAGCTCA CCTACCAAG TGCAGCACA ACCGCTCGCG CAGCGGGTGG GGTCTACGGC
 AGACGCTCGG GCGCTTAACC AGATGCGCGG GTTGTTCAG ACCTCTGAGT GGAGTGCTC AGCTGCTCTT TGGCGAGCGC GTCGCCACCG CCAGATGCGC
 GGGCTCATCT TCGAAGAGCG ATCGCCAGCT AATGTTTCAG GTAAACATC GCAAAAATC ATCGCGCGAG AGCCCAAGCT GCGCTACGTC GCGGTACCGC
 CCGGAGTAGA AGCTTCTCGG TAGCGGTGCA TTACAAAGTC CACTTTGTAG CTTTTTTTAC TACCGCGCTC TCGGGTTGGA CGCGATGCGC GCGCAGTGG

GTGCGACCTC CCGGTACAAG GATTGCTTG TCGACGGCAT CTGCGCGTA CAAATCCAG CCGCACTGCA GGGCAGCGTC GAAGCAGAAA AGGCATTGAT
 CAGGTGCGAG GCGCATGTTG CTAAACGAAC AGCTGCGTA GAAGCGGAT GTTTAGGTGC GGGGTGACGT CCGGTGCGAG CTTCGCTTTT TCGGTAAGTA
 CGCGCGCGTT CGTGAAGAGG TTGACCGCA GGTCCAGGTC TGGCGCGCA TCTCGATGTC CAGCCCGTTG GGGGCTGAAG TGGCAGAGGG TCAGCTCGAT
 GCGCGCGCAA GCACTTCTCC AACCTGGCGT CCAGGTCCAG ACCGCGCGCT AGAGCTACAG CTCGGGGAAC CCGCGACTTC ACCGTCTCCG ACTGCACTA
 AAGCTAATTC TTGATGCGCA TGAAGGTGGC ACCCGGGAAG TATTGAGTC GGTACGGTC CCGCGCGCTG TGAAGGCAAA GTCTTTGCTC GCGGAGGCA
 TTGATTAAG AACTACGGGT ACTTCCACCG TCGCCCGTTT ATAAGCTGAC CCGATGCCAG GGGCGCGCAG ACTTCGCTTT CAGAAACGAG CCGCTCCGT
 TCTCTCGGA CAACGCTCGG CAGGCACTCG CTCTGGGCTG CGCAGGTTTA GACATCAACT CTGGCGTGA ATACCGCGCG GGTGCAAGGA GGTGGGGCTG
 AGAGAGGCTT GTTGGGAGCG GTCTGTAGG CACACCGGAC GCGTCCAAAT CTGTACTGA GACCGACCTT TATGGGCGCG CCAGCTCCGT GCACCGCGAC
 GGGCGAAGA TCGCGCGCGG CTGCTGAAAA TTTTGGCGAC CATCTCCACA TTCCATTACT AAGGTTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAAA GAAAACTTGG
 CCGCTTTCT ACCGCGCGCG GACGACTTTT AAAAGCGCTG GTAGAGGTGT AAGTAATGA TTTCCAAAT TATCCTAGTA CTGACTTTTT CTTTTGAACC
 GCGGTCCAC GCTGCTACCT GCATACCTCG GTGAATTGCG CGGCGAGTTC TCGCGGAAT CCTCTCTGCC TGTCTGCGAC CAGCTGGAGA AGGCTTCTGT
 CCGCGAGCTG CGAGATGGA GGTATGAAG CACTTAAGCG GCGGTCAAG CAGCGCTTA GCGAGGACCG AGCAGAGCTG GTCGACCTCT TCGGAGGCA
 TGACGGGACC AACAGCCGAG AGTTCCGCGA AGAAGTCCGC GGTACCTCC GCGATTATCT CGGCGCGCCA ACCCGGCTGA CCGAATGCTC CAACCTGCCA
 ACTCGGCTGG TTGTGCGGTC TCAAGGCGCT TCTTACCCG CCGATGAGG CGCTAATAGA GCGCGCGGCT TGGGCGGACT GGTATTACGAG GTTGCAGGCT
 CTGCGAGCGG AAGGCAAGG CTTTGGCGCG ATCTTCTCA AGCGCGAAGA CCTGCTCCAC GCGGTGCGAC ACAAACTAA CCAGGTGATC GCGCAGGTG
 GAGGTCTCGG TTCCGTTTCC GAAACCGCGC TAGAAGGAGT TCGCGCTTCT GAGCAGGTG CCGCGACGTC TGTTTTGATT GGTCCACTAG CCGGTCCAGC
 TGCTTGGCAA GCGCATGGG AAAACCGGCA TCATGCGACA CACCGCGGCA GCGCAGCAG GACCGCGAC CGCTCTCGCA TGTGGCTCA TGGGCTCGA
 AGGAACGCTT CCGGTACCGG TTTTGGGCGT AGTAGGCTCT CTGCGCGCT CCGGTCTGTC GGTGGCGGTG GCGAGAGCTT ACACGCGAGT ACCCGAGCT
 GTGCGTGTG TACATGCGG CCAAGGAGCT TCGCGCGCAG CAGCGCAAG TCTACCGCAT GCAGTGCAC GCGCGCAAGG TCATCCCGCT GGAATCTGCT
 CACGCAACAG ATGTACCGG GGTTCCTGCA ACGGCGCGTC GTGCGGTGCG AGATGGGCTA GGTGAGCTG CCGCGCTTCC AGTAGGGCA CTTAGACCA

特開昭62-244382(5)

TCGGGCACCC TCAAGGACCC CGTGAATGAA GCGCTGCGCG ATTGGACCGC AACCTTCACG GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGCGCC GGGCCGACCC
 AGCCCGTGGG ACTTCTCTCGG CCACTTACTT CCGGACGCGC TAACCTGCGC TTGCAAGGTC CTCAGGCTGA TGGAAAGACC GTGGCGCGCG CCGGCGCTGG
 CATTCGCAAC CATCGTGGCT GAATTCACCA AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AAGGCACAGA TGCTAGAGCG CACCGGCAAG CTTCGCGAGC TTGTGGTGGC
 GTAAGGCTTG GTAGCAGCCA CTAAAGGTGT TCCACTAGAG ACTCCTTCGG TTCCGTGTCT ACCATCTCGC GTGGCGCTTC GAAGGCTGCG AACACCAAGC
 CTGTGTGGGT GGTGGCTCCA ACGCCATCGC CATGTTGGCA GACTTCATTG ACGATGAAGG CGTAGAGCTC GTCGGCGCTG AGCCAGCGCG TGAAGGCTCG
 GACACAGCCA CCACCGAGGT TCGGGTAGCC GTACAAGCGT CTCGAAGTAAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCCGCGAC TCGGTCTGGC ACTTCCGGAG
 GACTCGGGCA AGCAGCGCGC AAGCATCACC AACGGTCAGA TCGGCATCCT GCACGGCACC CGTTCCTACC TGATGCGCAA CTCGACGCGC CAAGTGGAG
 CTGAGGCGGT TCGTGGCGCG TTGGTAGTGG TTGCCAGTCT AGCCGTAGGA CGTGGCGTGG GCAAGGATGG ACTACGCGTT GAGGCTGCGG GTTCACCTTC
 AGTCTACTC CATCTCGCGG GGACTTGATT ACCCAGGCGT CCGCCACAGC ACGCACACCT GCACCGCACC GCGCGCACT ACCTTGGTAT CACCGACGCG
 TCAGGATGAG GTAGAGCGCG CCTCAACTAA TGGGTCCGCA GCGGCTCTCG TCGGTGTGGA CGTGGCGTGG CCGCGCGTGA TGAACCCATA GTGGCTCGCG
 GAAGCCCTCC AAGCATTCGA GTAGCCTCGC CGGCTACGAA GGCATCATCG CCGGCACTGG AATCCTCACA CGGTTTCGGC TACGACTCAA GCGCGCCAA
 CTTCGGGAGG TTGCTAAGGT CATCGGAGCG GCGGATGCTT CCGTAGTAGG CCGCGTGACC TTAGGAGTGT GCGCAAGCGG ATGCTGACTT CCGCGCGTCC
 ACCGCGGAAG AGGAAGGCGA GAACCTAACC ATCCTCTCTT CCGTATCCGG CCGTGGCGAC AAGGACGTTG ACCATCGCGC CCGCAGCCCTC GAAGAAATC
 TGGCGGCTTC TCCTTCCGGT CTTCATTTGG TAGGAGCAGC GCGATAGGCC GGCACGCGTG TTCTTCCAAC TGCTAGCGCG GCGGTGGGAG CTCTTTTAG
 CAGAATGAT CCTGAAGGAC AACCGATGAG CCGTTACGAC GATCTTTTGG GCGAGCGCTC GACAGGCTCA GCGGAGGGCG CTTTGTCTCC CTTCATCATG
 GTCTTGACTA GGACTTCTCG TTGGCTACTC GCGAATGCTG CTAGAAAAAC CGCTCGGGAG CTGTGCCAGT CCGCTCCCGC GGAACACAGG GAAGTAGTAC
 CTGAGCGACC CTTACCCAGA GGAGGCTTTC CAGATCATCT CCACAGCAAT CGAACGTGGC GCAGATGCAC TGGAACTTGG CGTACCTTTC TCGGACCCAG
 GACTCGCTGG GAAGTGGTCT CCTCCGAAGG GTCTAGTAGA GGTGTGTTA GCTTGACCGC GGTCTACCTG ACCTTGAACC GCATGGAAAG AGGCTGGGTC
 TTGCGCATGG CCGCAGCGTC GCGGAATCCG ACCTCGCGCG ACTCGAAGGG GCGGCCACCG TAGACAGCGC ACTCGAGCAG ATCAAGCGCG TCGCGCGAGC
 AACGGCTACC GCGGTGGCAG CGCCTTAGGG TGGAGGCGCG TGAGCTGCGC CCGCGGTGGC ATCTGTGCGC TGAGCTCGTC TAGTTCGCGC AGCGCGCTCG

 CTACCCAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAAC GTTCTTTTCA CCGGTGGCTT GGATCGCTTC TACCAAGACT TCGCTGAAGC TGGCGCAGAC
 GATGGGTCTC CAAGGGTAGC CTACGAGTA GATGCGGTTG CAAGCAAGT GGGCACCGAA CCTAGCGAAG ATGGTTCTCA AGCGACTTCG ACCCGCTCTG
 TCCATCCTCC TGGCAGAGCT CCGAGTCCCG GAAGCGCGAC CGTTTTCTGC AGCAGCGCGA GTTCATCCCA TTACATCCCG TCGGCGCAAC GCGAGCGAGA
 AGGTAGGAGG ACGGTCTGCA GGGTCAGGCG GTTCCGCGTG GCAAAAGAGG TCGTGGGCTT TAAGTAGGCT AAATGTAGCG AGGCGGCTTG GGTGCGCTCT
 AAACCTCGA GGGTCTCTCC GCGGCATCAA AGGGCTACAT CTACGGCATC TCGGCGGAGC GCGTCACCGG CACCGAAGCT GAATCATCCA CCGAGCGGCT
 TTGGGAGCT CCGACAGAGG CCGCGTAGTT TCCGATGTA GATGCGGTAG AGGGCGCTCG CGCAGTGGCG GTGGCTTGA CTAGTGGGT GGTGCGCGGA
 GTCCGCGATG GTGCACAACA TCAAGAAATT TGATGGCGCA CCGATCTCTT TCGGCTTCGG CGTCTCATCC CCTCAGCAGC TGGCAGACCG GATTGACGCG
 CAGGCGTCA CACCTGTTGT AGTTCTTTAA ACTACCGCGT GGGTAGGAGA ACCCGAAGCC GTGCAGTAGG GGAGTCTGCG ACCGTCTGCG CTAAGCTGCG
 GGTGCTTCCG GTGCGATCAC GGGTTCGCGC ATACCAAGA TCATTGCTTC CCACTGCGAA GGTGAGCACC CGAACCCCTC CACCATTCGA CATATGGAGC
 CCACGAAGGC CACGCTAGTG CCCAAGCGCG TAGTGGTTCT AGTAACGAAG GGTGACGCTT CCACTCGTGG GCTTGGGCGG GTGTAAGCT CTATACCTCG
 GTTGAAGAA GGATCTCACT GAGTTCTAT CTGCGACTGA AGCGAGCGAC CAAGAAGGTT TAGGCTTTA AATGTGGCAA TGTTTCAGCT GAAACATTOT
 CAACCTTCTT CTAGAGTGA CTCAAGTAGA GACGCTGACT TCGTCTGCTG GTTCTTCCAA ATCCGGAAT TTACACCGTT ACAGAGTGA CTTTGTAAAG
 GAGACAATGT AGAAACATCA AAGAAGCCAC CTCCTAGCTC TCGGGCTGGG AGCGCGCTTC TTGTTTGGG GTTTAGGAAA TCTCAGGCTT TTGGAGATCT
 CTCTTTACA TCTTTCTAGT TTCTTGGGTG GAGGATCGAG AGCCCGAGCC TCGCCGGAAG AAACAACGC CAATCTCTT AGAGTCCCAA AACCTCTAGA
 TAGCTTCGAG CCGCTGGGGT AGGAGCGCGC GCGGAGGAG CAATCTTAGG GTAGGTCCGA GCGCCAGCGG TTGGAGTGGG ATCAGCTTC GCGTTGGCA
 ATCGAGCTG GCGCACCGCA TCCTGCGGGG CCGCTCTCTC GTTAGAATCC CATCCAGCT CCGGCTCGCG AACCTCAGCG TAGTGAAGG CCGAAGAGGT
 CCGCGCTAGC GTTGGGAGCT GATCC
 GCGCGGATGC CAACCTCGA CTTAGG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNA が人工的に合成されたDNA 又は微生物に由来するDNA である特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がブレヴィバクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNA が1部置換、変異又は削除されたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNA がプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNA を用いるL-トリプトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中

A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラギン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリアトファン、Y チロシンを示す。

なお、第2式はトリプE酵素、第3式はトリプG酵素、第4式はトリプD酵素、第5式はトリプC酵素、第6式はトリプB酵素、第7式はトリプA酵素のアミノ酸配列を示す。)

第 2 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
HSTNPHVPSL DRYBEDASA LFAHLGGITA DDAALLESAD ITTKNGICSL AVLKSSVRIT CTGNTVVTP LTDSGRAVVA RLTOQLGOYN TAENTFSPPA

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
SDAVDERERL TAPSTIEVLR KLOFESGYSD ASLPLLHGCF APDFLETPET LPAVEESVHT YPDYQPVLAQ IVLDINHQQQ TAKLTGVSNA PGELEAELNK

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
LSLLTDAALP ATEBAYOTTP HOGDTLRVVA DIPDAQFRTO IMELKENIYN GDIYQVVPAR TFTAPCPDAF AATLQLRATN PSPYHFYIRC LNEGRSYELF

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
CASPEENLKF TAANRELQLY PIACRPRCL NPDGSINDEL DIRNELDHT DAKELADDTH LVDLARNDLA RVSYPASRRV ADLLOVDVRS RVHHLVSRVT

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
ATLDPELDAL DAYRACHNMG TLTGAPKLRA HELLRGVEKR RRGSYGGAVG YLRGNGDNDH CIVIRSAFVO DGVAAVQACA GVVROSNPOS EADETLKAY

510     520
AVLNAIALAA CSTLEVR -

```

第 3 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 NTHVVLIDNH DSFYVNLVDA FAVAGYKCTV FRNTVPVETI LAANPDICL SPGPGYPADA GNMHALIERT LGQIPLLGIC LGYQALIEYN GGNVEPCGPV
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 BCTTDNMILT DAGVQSPVFA GLATDVEPDH PEVPGRKVPI GRYNHSLGCVV APDGIESLCT CSSEIGDVIH AARTTDGKAJ GLQFHPESVL SPTGPIILSR
 210
 CVEOLLAN*

第 4 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 NTSPATLKVL NAYLDNPTPT LEBATEVFTV LTVGEYDDVH IAALLATIRT RGEQFADIAG AAXAFLAAR PFPITGAGLL DSAGTGGDGA NTINITTGAS
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 LIAASCGVKL AKHGHRVSYS KSGSADVLEA LNIPLGLDGD RAVKWFESW FTPLFTPAYN PAIAHVQPVV QALKPPTIFN TLGPLLSPAR PERQINGVAN
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ANHCOLIAEV FRELCRTRAL VVHCAGTDEI AVHGTTLVWE LKEDCTIEDY TIEPEDLGLG RYTLEDLVGG LGTENAEAMR ATFACCTGPA HRDALAASAG
 310 320 330 340 350
 AMPYLNQDGD SLKDCAGXAL SLLADATTOA WLAKBEEIDY SEXESSND*

第 5 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTSNNLPITVL ESIVEGRRCN LEEIRARIAH VQYDALPKST RSLFDSLNGG RGGARFIMEC KSASPSLGMH RENYQPGELA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GQYDHLATVC ATSHLPVLCK DFIIDPVQVR PARYFGADAI LLHLSVLDD EYDALAAEAA RFDLDILTEV IDEEEVARAI KLGAKIFGVN HRMLHLSID
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 LDRSRRLSKL IPADAVLYSE SGVROTETVR QLCGDSNAFL VGSQLTSDEN VOLAARELVY GPNKVCGLTS PSAAQTARAA GAVYGGGLIFE EASPRNVSRE
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TSQXIIAAEP NLRVVAVSRR TSGYKOLLVD GIFAVQIDAP LOGSVAEAKA LIAAVREEVG PQVQVWRAIS MSSPLGAEVA EGDVDXLILD ANEGGSGEVF
 410 420 430 440 450 460 470 480
 DNATVPAAVK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV GCAGLDINSG VEYPACACTW GWGERCRRAA ENFRDHLNIP LLKV -

第 6 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTEKENLGGG TLLPAYFCEP GQDFVAESLL PALDOLERAF VDATNSPEPR EELGGYLRDY LGRPTPLTEC SNLPLAGECK GFARIFLKBE DLVHGGAHKT

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HOVICOVLLA KRMGKTRIIA ETCAGQHGTG TALACALMGL ECVVYHCAKD VARQOPNVYR MQLBGAKVIP VESGSGTLKD AVNEALROWT ATFHESHYLL

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GTRAGPHPPF TIVREFHKVI SEEAKAQNLE RTGKLPQVVV ACVGGGSNAI GNFADFIDDE GVELVGAEPG GEGLDGSKNG ATITNGQIGI LNCSTRSYLMR

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
NSDCQVEESY SISAGLDYPC VGHSTHTCTP PARTTLVSPT PXPSKHSSSL ARYEGIIPT CILTRVRLRL KRAKTAEEBG QNLTILVSLG CRGDKVDVHR

410     420
ACTLEENPEL ILKDNR

```

第 7 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MSRYDDLFGD ASTRSGEGAF VPFIMLSOPS PEEAFQIST AIERGADALE LGVPPSDPVA DGPTVAESNL RALDGGATVD SALEQIKRVR AATPEVPICH

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIYGNVPFTR GLDRFYDEFA EAGADSILLP DVPVREGAPF SAAAGIDPIY IAPANASEKT LEGVSAASKG YIYAISSRGV TCTERESSTD GLSAVVDNIR

210     220     230     240     250     260     270     280     290
KFDGAPILLG FGISSQHYVA DATAAGASGA ITGSAITKII ASHCEGEHPN PSTIRDMDGL KKDLTEFISA TEGSDDEGLG L

```

11) アミノ酸配列が1部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。

12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。

13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアテニュエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるL-トリプトフ

ァンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌 (Coryneform bacteria) は、バージース・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergeys Manual of Determinative Bacteriology) 第8版 599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

ブレバクテリウム・サッカロリチウム	
	ATCC 14066
ブレバクテリウム・インマリオフィウム	
	ATCC 14068
ブレバクテリウム・ラクトフェルメントム	
	ATCC 13869
ブレバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
ブレバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
ブレバクテリウム・チオゲニタリス	
	ATCC 19240
コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	
	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	
	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミカム	
	ATCC 13032, 13060
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	
	ATCC 17965

し（例えばH.Saito and K.Miura Biochem.Biophys. Acta 72,619(1963)の方法が使用できる。）、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン生合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離（クローン化）できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼーションにより、単離可能である。

マイクロバクテリウム・アンモニアフィルム	
	ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアテニューエーター、さらにリーダーペプチドをコードする領域（trpL）、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子（trpE, trpG）、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子（trpD）、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子（trpC）、トリプトファンシンターゼ遺伝子（trpB, trpA）の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

ンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、巾広い種類の制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその1部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくはE.coli、B.subtilisにおいて増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

(1) pAM 330	特開昭58-67699参照
(2) pAM 1519	特開昭58-77895参照
(3) pAJ 655	特開昭58-192900 参照
(4) pAJ 611	同 上
(5) pAJ 1844	同 上
(6) pCG 1	特開昭57-134500 参照
(7) pCG 2	特開昭58-35197参照
(8) pCG 4	特開昭57-183799 参照
(9) pCG 11	同 上
(10) pCC 1	特開 (Nautin/Ajico)

- (11) pBL 100 特開 ()
 (12) pBR 322
 (13) pC 194

ベクターDNAの開裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

法、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Choan, S.M., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, D.A., Nature, 274, 398 (1978); Rinnen, A., Hicks, J.B. and Frink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のバチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得るとができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはブレバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルバ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

ブレバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, H. Sato, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 36, 2315 (1972))、ブレバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, S. Sugimoto, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 627 (1975))、ブレバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アゼセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、p-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(H. Hagino, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 345 (1975))等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成蓄積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に、応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含有する澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にトリプトファンの生産濃度が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、ブレビバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌内においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えば、インク

ーフュロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが常用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるトリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニューエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合わせた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異ならないように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びトリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるトリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

実施例 1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

1-1 ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225 (PERM-P4370) を 1 ml の CHG 培地（ペプトン 1 g / ml、酵母エキス 1 g / ml、グルコース 0.5 g / ml、及び NaCl 0.5 g / ml を含み、pH 7.2 に調整したもの）に接種し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDS で溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に 3.5 μg の DNA を得た。

1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとして pAJ1844（分子量 5.4 メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するプレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037を100 mlのCMG培地に接種し、30℃で対数増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心により上清を得た。フェノール処理ののち、2容のエタノールを加えてDNAを沈澱回収した。これを少量のTEM緩衝液(20 mMトリス塩酸塩、20 mM NaCl、1 mM EDTA (pH 8.0))に溶解後、塩化セシウム-エチジウムブロミド密度勾配平衡遠心によりプラスミド画分を分離し、最終的にpAJ1844プラスミドDNA約200 μgを得た。

1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1で得た染色体DNA 10 μgと1-2で得たプラスミドDNA 5 μgとを制限エンドヌクレアーゼPst Iでそれぞれを37℃に1時間保持し、切断した。65℃にて10分間加熱した後、両反応液を混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、T₄ファージ由来のDNAリガーゼによって10℃にて24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

を集め、菌体を0.5 Mシュクロース、20 mMマレーン酸、20 mM塩化マグネシウム、3.5 %ベナッセイブロス(Difco)からなるSHMP培地(pH 6.5) 0.5 mlで洗浄した。次いで10 mg/mlのリゾチームを含むSHMP培地に懸濁し30℃で20時間プロトプラスト化を図った。6000×g、10分間遠心分離後、プロトプラストをSHMPで洗浄し0.5 mlのSHMPに再度懸濁した。この様にして得られたプロトプラストと1-3で調製したDNA 10 μgを5 mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレングリコールを最終濃度が30 %になる様に添加した後、DNAをプロトプラストに取り込ませるために室温に2分間放置した。このプロトプラストをSHMP培地1 mlで洗浄後、SHMP培地1 mlに再懸濁し、形質発現のため、30℃で2時間培養した。この培養液をpH 7.0のプロトプラスト再生培地上に塗布した。プロトプラスト再生培地は蒸留水1 mlあたりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 12 g、KCl 0.5 g、グルコース 10 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8.1 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.2 g、

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈澱を採取した。

1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのアンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株№38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠損株№30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変異処理することにより分離した)をDNA受容菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストトランスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を5 mlのCMG液体培地で対数増殖期の初期まで培養し、ペニシリンGを0.6 ユニット/ml添加後、さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により菌体

ベプトン4 g、粉末酵母エキス4 g、カザミノ酸(Difco社) 1 g、 K_2HPO_4 0.2 g、コハク酸ナトリウム 13.5 g、寒天8 g及びクロラムフェニコール3 μg/mlを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニーが出現してきたのでこれを最少培地(2 %グルコース、1 %硫酸アンモニウム、0.3 %尿素、0.1 %りん酸二水素カリウム、0.04 %硫酸マグネシウム7水塩、2 ppm鉄イオン、2 ppmマンガンイオン、200 μg/lサイアミン塩酸塩、50 μg/lビオチン、カザミノ酸(Difco) 3 g/l、クロラムフェニコール10 μg/ml、pH 7.0、寒天1.8 %)にレプリカし、クロラムフェニコール耐性でかつトリプトファン要求性の消失した株をAS60を用いた区分から2株、№38を用いた区分から1株、№30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、いずれのプラスミドもベクタープラスミドpAJ1844よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、№38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、№30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851を№38に、ptrpB301を№30に再度形質転換した。

生じたコロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンター

ゼβサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2 で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

実施例2.

ブレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング
ブレバクテリウムラクトフェルメンタム
AJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性の№1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI 或いはSalI、又はXhoIで完全に切断し、E.coliのベクターpUC18(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、E.coli JM109(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside), IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンピシリンを含むし寒天培地にプレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー合計約1500コロニーをニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kbのPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼーション(Grunstein, M., Wallis, J.: Methods in Enzymology, 68, 379, Academic Press Inc., New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブクロー

ンを得た。BamHI区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。その結果、ptrpE97はptrpE36、ptrpD3851、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36のPstI断片及びptrpD3851のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング

第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

3-1 trpC遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド plac プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約2.6 kb. の SstI-Hind III断片を分画し SstI, Hind III で切断した pUC18 (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lacZ53, rpsL8, λ^-) を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いは SstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、E. coli の要求性を消失させた。

3-2 trpA遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド p

列はブレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要なRNAポリメラーゼの結合部位 (trp プロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) に対応するDNA配列、及び停止配列 (ターミネーター) を含むことが判明した。

又、プロモーターと trpE 構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッションに関与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アテニュエーションに関与するリーダーペプチド (trpL) をコードする領域とアテニュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された (第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

約2.4 kb. の NruI-BamHI断片を分画し、SmaI, BamHI で切断した pUC18 に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5644 (trpA33, rha-7, λ^-) を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

実施例4.

トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例1で得られた p

実施例5.

プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、p\kappakl75-6 (アンピシリン耐性 (Ap)、テトラサイクリン (Tc) 感受性) (Brosius, J., Gene 27, 151 (1984)) にサブクローンした。得られた組換えプラスミド p

さらに、pAN330 由来のトリメトブリム耐性のベクター、pAJ226 の PstI 切断部位に PstI で切断した上記組換えプラスミド p

第1表 カザミノ酸を添加した最少増地におけるテトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性

	テトラサイクリン耐性度 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)			クロラムフェニコール耐性度 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
	トリプトファン無添加	トリプトファン添加 (1 mg/ml)		トリプトファン無添加	トリプトファン添加 (1 mg/ml)
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	20	20	ptrpP05 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	25	5	ptrpP06 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	20	20	pEB003TR* in <i>E. coli</i>	400	200
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	20	20	*pEB003TRは <i>E. coli</i> のトリプトファンプロモーターを有している		

スミド pAJ234 を用いて、L-トリプトファン生産について検討した。

pAJ234 を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株 *レバ* *バクテリウム・ラクトフェルメンタム* M247 を用いて述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られた AJ12195 (FERM-P8014) を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産増地 (グルコース 130 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 g、フマル酸 12 g、酢酸 3 g、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、d-ビオチン 50 μg 、サイアミン塩酸塩 2000 μg 、メチオニン 400 mg、チロシン 650 mg、大豆蛋白加水分解液「味液」50 ml、 CaCO_3 50 g を水 1 l に含む、pH 6.5) 20 ml を 500 ml の坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中の L-トリ

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII断片をAluI或いは、HaeIIIで切断し、各断片をpKK756上にサブクローン化した (第5図)。その結果AluI-HindIII断片 (51bp) 及び HaeIII-HindIII (135bp) 上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を*E. coli*のプロモータープロベクター pKK232-8 (Ap耐性、クロラムフェニコール感受性) を用いて得ており、AluI-HindIII断片 (51bp) 上にプロモーターが存在することを確認した。

実施例6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (*trpD*)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (*trpB*, *trpA*) の増幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングした *プレビバクテリウムラクトフェルメンタム* トリプトファンオペロンのうち *trpD*, *trpC*, *trpB*, *trpA* の4遺伝子を有する組換えプラ

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8042 を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株のL-トリプトファン蓄積量

菌株	L-トリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dl
FERM P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dl

尚、M 247 を得るためには寄託された AJ 12195 より宿主細胞を壊すことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失われることもあるし、「除去」操作によって除くこともできる (Bact. Rev., 36, p361-405 (1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195 を CMG 液体培地に接種し、37℃で一晩培養 (高温処理) 後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しない CMG 寒天培地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクラロム

フェニコール感受性株として分離される株が
M 247 である。

4. 図面の簡単な説明

第1図

組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素
地図

第2図

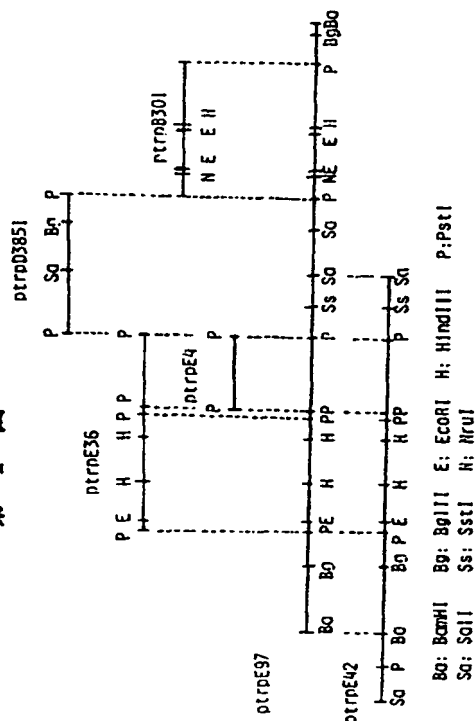
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの塩基配列決定のため
の戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18,
pUC19 或いはM13mp10 にクローン化し、矢印で
示した方向へ、dideoxy 法により塩基配列を決
定した

第3図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの制御領域
—ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
trpE構造遺伝子の5'上流域の塩基配列並びに
推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

第1図



RNA の2次構造—

第4図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の単離、同定のための戦略

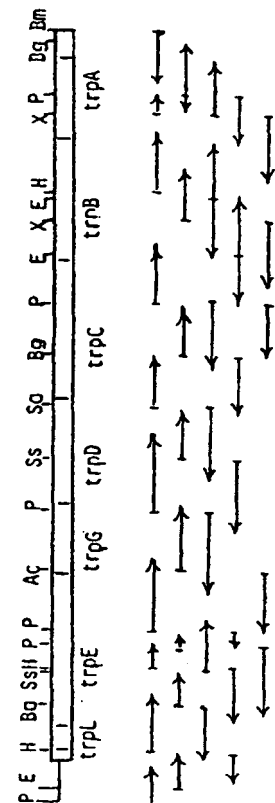
第5図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の限定のための戦略
-35 及び-10 はE.coliのプロモーターコンセン
サス配列の-35、及び-10領域に相当する領域
を示す

第6図

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンのターミネーターの構
造

第2図



特許出願人 味の素株式会社

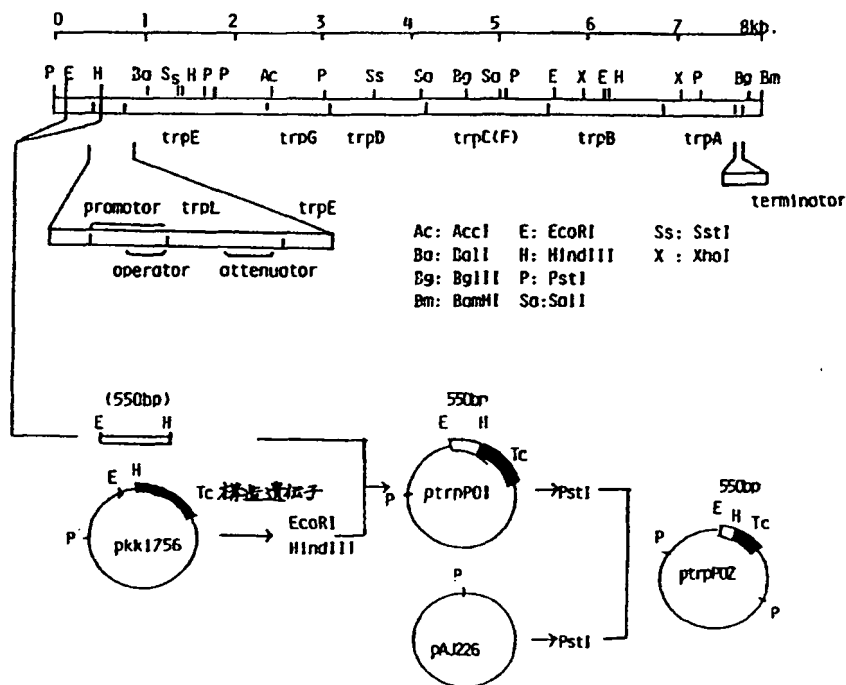
第 3 図

trpL
MetAsn
-35 IACACAGAACCCAAATGATTAAATAGACAAAGCTTCCACATATGTGATAAAGTCCCATTTTGTGAAT
-10
AsnSerCysLeuSerGlnSerThrGlnTrpTrpTrpTrpArgAlaAsn...
AACTCTGTCTCAGTCAAAGCACCAGTGGTGGTGGCGCGCTAACTAAGCGAGCCTGACACCTCAAGTTGTTT
TCACTTTGATGAATTTTTTAAGGCTCGTACTTCGTTCGACGAAGAAGCGGGGCTTTTGTGGTTTTTAGCCAC
AACCGCAAGCCCTGGATCGAATGAAGCTCGACGAGAGTAATTATTGATGTTTCCACAAAGGCTTCAGCCC
MetSerThrAsn
CACAAATGATTTCCACGGTAGGTGGCCCATGAGCAGCAAT
trpE

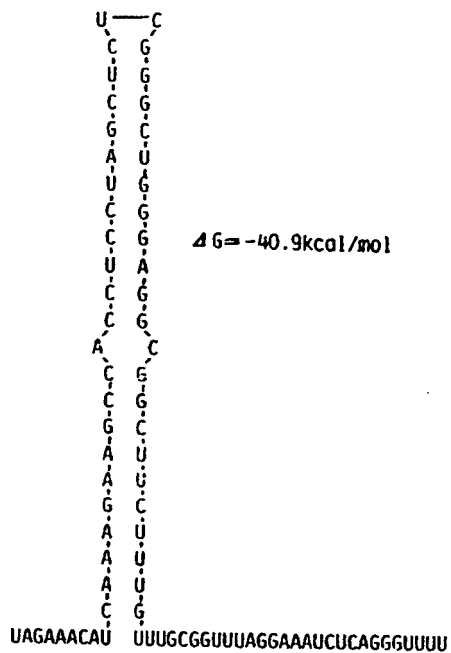
第 5 図

HaeIII
AGGAGGCGCG TGGTGTGACT ATTAGCTGCG CGATTATCAA CAAGACTCGG CTGAATGCGG CCAAGATTGA
TCTCTGCGCC ACCACACTGA TAATGAGGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGGC GACTTACGGG GGTTCCTAAGT
HindIII
CTTGATGCA GTGGTAGAG CTGGGGAAC TACACAGAA CCCAAATG ATTGATATG GAGCAGCT T
GAACCTACGT CAGGCATCT GAGCGCTTGG ATGCTTCTTAC TAACTATTA CTTCTGTGCA A

第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. 4

// C 12 P 21/02
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:13)
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

6712-4B

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第87600号

2. 発明の名称

トリアトファンオペロン、トリアトファンオペロンにコード
されるペプチド及び蛋白、トリアトファンオペロンの遺伝子
発現利用方法及びトリアトファンの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社

4. 補正命令の日付

自來

5. 補正により増加する発明の数 なし

6. 補正の対象 明細書、発明の詳細な説明の欄

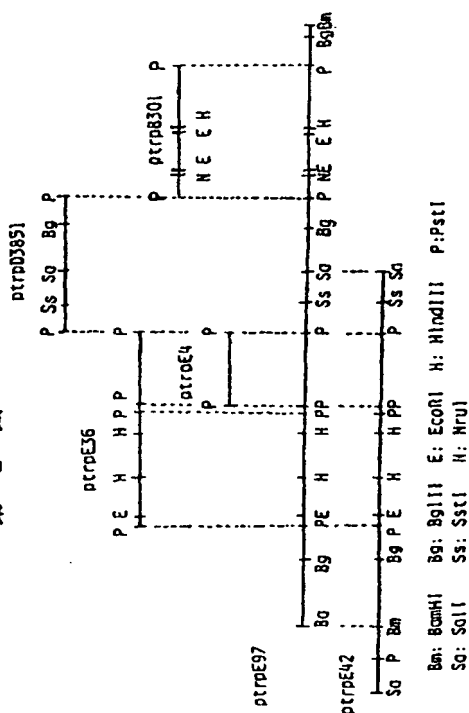
および図面（第1図、第2図、第4図）

6. 4

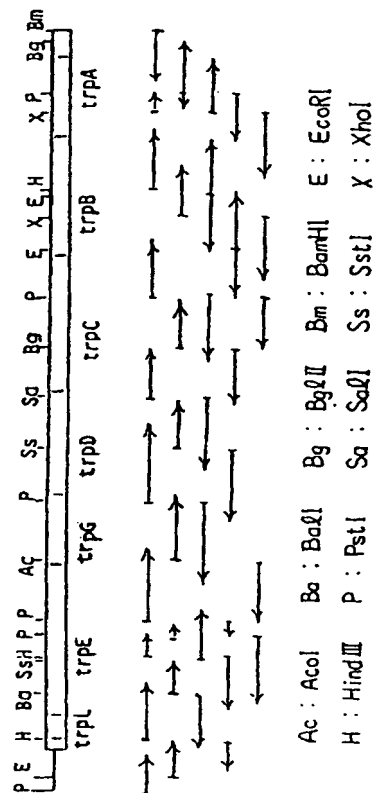
●

2000

區一第



第 2 区



7. 補正の内容

(1) 明細四第11頁11~14行目「なお、第2式は・・・配列を示す。）」を「尚、第2式はtrp E、第3式はtrp G、第4式はtrp D、第5式はtrp C、第6式はtrp B、第7式はtrp A各構造遺伝子の塩基配列から推定される各アミノ酸配列を示す。）」と訂正する。

(2) 第1図、第2図、第4図を別紙の通り訂正する。

以上

第 4 図

